

製品コード R110A

研究用

TaKaRa

TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA)

説明書

v201910Da

TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA) は、バイサルファイト処理後のウラシルを含む DNA を鋳型として PCR 増幅を行うために最適化した PCR 酵素です。バイサルファイト処理を行った DNA は PCR の反応性が変化することがありますが、本酵素ではマグネシウム濃度や dNTP 濃度を調整することにより増幅効率、反応特異性を調節できるため、これまで増幅できなかったターゲットに関しても良好な増幅を行うことができます。

また、本酵素は、抗 *Taq* 抗体を含むホットスタート PCR 用の酵素です。高温に加熱するまでは抗 *Taq* 抗体が酵素に結合しポリメラーゼ活性を抑えているため、PCR サイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができます。そのため、特別な変性ステップは必要なく、従来の PCR 条件で使用できます。

I. 内容 (200 回分、50 μ l 反応系)

1. TaKaRa EpiTaq HS (5 U/ μ l) *	250 U
2. 10 \times EpiTaq PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	1 ml
3. dNTP Mixture (各 2.5 mM)	1.2 ml
4. 25 mM MgCl ₂	1.2 ml

* :【酵素の形状】

20 mM	Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0)
100 mM	KCl
0.1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.5%	Tween 20
0.5%	NP-40
50%	Glycerol

【活性の定義】

活性化サケ精子 DNA を鋳型/プライマーとして用い、74°Cにおいて、30 分間に 10 nmol の dNTP を酸不溶性沈殿物に取り込む活性を 1 U とする。

II. 保存

− 20°C

III. 一般的な PCR 反応液組成 (Total 50 μ l)

試薬	使用量	最終濃度
TaKaRa EpiTaq HS (5 U/ μ l)	0.25 μ l	1.25 U / 50 μ l
10 \times EpiTaq PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	5 μ l	1 \times
25 mM MgCl ₂	5 μ l	2.5 mM
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	6 μ l	0.3 mM
Template	< 100 ng	
Primer 1	20 pmol	0.4 μ M
Primer 2	20 pmol	0.4 μ M
滅菌精製水	up to 50 μ l	

まずは上記の反応液組成でお試してください。増幅しない、エキストラバンドができるなどの問題が生じた場合、MgCl₂、dNTP Mixture またはプライマーの濃度を検討することで改善する場合があります。詳しくは、IX. トラブルシューティングをご参照ください。

PCR 反応液の調製は室温でも可能です。ただし、酵素などの各試薬は氷上に置いてご使用ください。

IV. PCR 条件

98°C	10 sec. *1	} 30 ~ 40 cycles
55°C	30 sec.	
72°C	30 sec. (~ 500 bp) or 1 min. (500 bp ~ 1 kb) *2	

- * 1 : 変性条件は使用 PCR 装置とチューブの種類に合わせて設定してください。設定の目安としては 98°C の場合は 5 ~ 10 sec.、94°C の場合は 20 ~ 30 sec. です。
- * 2 : 増幅サイズに応じて設定してください。増幅サイズが 500 bp 以下の場合は 30 sec.、500 bp ~ 1 kb の場合は 1 min. を目安としてください。1 kb を超える増幅を行う場合は、1 min./1 kb を目安に設定してください。
なお、バイサルファイト処理工程で鋳型 DNA が損傷を受けた場合には、増幅鎖長が大きくなるにつれて増幅効率が低下する場合があります。

V. 増幅産物の電気泳動

反応終了後、反応液の一部 (5 ~ 10 μ l) に 6 \times Loading Buffer を 1/5 量加え、アガロースゲル電気泳動を行います。アガロースゲルの種類、濃度は DNA のサイズによって使い分けてください。電気泳動終了後のゲルを 1.0 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液、もしくは SYBR[®] Green I 溶液 (TBE buffer または TAE buffer で 10,000 倍希釈したもの) 中に 20 ~ 30 分間放置染色後、紫外線照射によって DNA のバンドを確認します。

VI. PCR 産物について

TaKaRa EpiTaq HS を用いて増幅した PCR 産物のほとんどは、3' 末端に A が 1 塩基付加されています。したがって、その PCR 産物をそのまま T-Vector [pMD20 (製品コード 3270)、pMD19 (Simple) (製品コード 3271) など] にクローニングすることができます。また、末端平滑化およびリン酸化を行って、平滑末端のベクターにクローニングすることも可能です。

VII. プライマー設計について

バイサルファイト処理後の配列に対するプライマー設計は専用の設計ツールを利用されることをお勧めします。下記の設計ツールは、フリーのオンラインツールです。(操作方法の詳細は、各ツールの Help 等でご確認ください。)

なお、バイサルファイト処理後の DNA を鋳型として確実に増幅するためには、増幅サイズが 300 bp 以下になるようにプライマー設計することをお勧めしますが、弊社では、約 1 kb までの増幅を確認しています。(VIII. 実験例 参照)

MethPrimer

<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>

MethPrimer - Design Primers for Methylation PCRs

Home Protocols Resources FAQ Help

Paste a ORIGINAL source [sequence](#). Try this [Sample sequence](#)
You don't need to modify your sequence (e.g. convert 'C' to 'T') before pasting.

Pick primers for [bisulfite sequencing PCR](#) or [restriction PCR](#).

Pick **MSP** primers.

Use [CpG island prediction](#) for primer selection?

Window: 100 Shift: 1 Obs/Exp: 0.6 GC%: 50

Submit Reset

Primer Design and Search Tool

Menu

- Primer tm
- Primer score
- Simple search
- Primer search, ePCR
- Primer design
- MSP design
- Parameters
- Help
- Manual
- Faq
- Manuscripts
- ChangeLog
- Genome builds
- Comments
- Statistics

Search Methylated Specific Primers

Sequence:

Biulfite: Use sense or antisense chain.

Set search region for: Forward primer: Reverse primer:

Max length of PCR:

Min bp diff:

CpG sites: let only in one or both primers.

Search primers Clear input

Parameters

Primer annealing temperature:

Primer conc: mikromol Glycerol conc: %

Potassium conc: mMol Ethylen glycol conc: %

Magnesium conc: mMol Formamid conc: %

Primer scoring values:

Help

Search the best primer pairs for PCR a sequence.

Online help system

The dynamic online help system informs you about each input field. Move the mouse over the input field you would like to get on, and read the help there.

BiSearch

<http://bisearch.enzim.hu/?m=msp>

MethPrimer - Design Primers for Methylation PCRs

Home Protocols Resources FAQ Help

General Parameters for Primer Selection

Sequence name (optional):

Target (optional): "start, size", such as (560, 30)

Excluded Regions (optional): "start, size", such as (160, 50
1100, 50)

Number of output pairs (optional):

Product Size:	Min: <input type="text" value="100"/>	Opt: <input type="text" value="200"/>	Max: <input type="text" value="300"/>
Primer Tm:	Min: <input type="text" value="50"/>	Opt: <input type="text" value="55"/>	Max: <input type="text" value="60"/>
Primer Size:	Min: <input type="text" value="20"/>	Opt: <input type="text" value="25"/>	Max: <input type="text" value="30"/>
Product CpGs:	<input type="text" value="4"/>	Primer Poly X:	<input type="text" value="5"/>
Primer non-CpG 'C's:	<input type="text" value="4"/>	Primer Poly T:	<input type="text" value="8"/>

※ タカラバイオ (株) では、プライマーの合成サービスを行っております。詳細は弊社受託窓口までお問い合わせください。

TEL 077-565-6999

タカラバイオ (株) <http://www.takara-bio.co.jp/>

4

製品コード R110A

VIII. 実験例

バイサルファイト処理を行った HeLa ゲノム DNA を鋳型とした PCR 増幅

【方法】

バイサルファイト処理：MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (製品コード ME002)

ターゲット：CDH1、MLH1、BRCA1 gene 上流の CpG アイランド領域

増幅サイズ：153 bp (CDH1)、297 bp (CDH1)、136 bp (MLH1)、292 bp (MLH1)、613 bp (BRCA1)、1,017 bp (BRCA1)

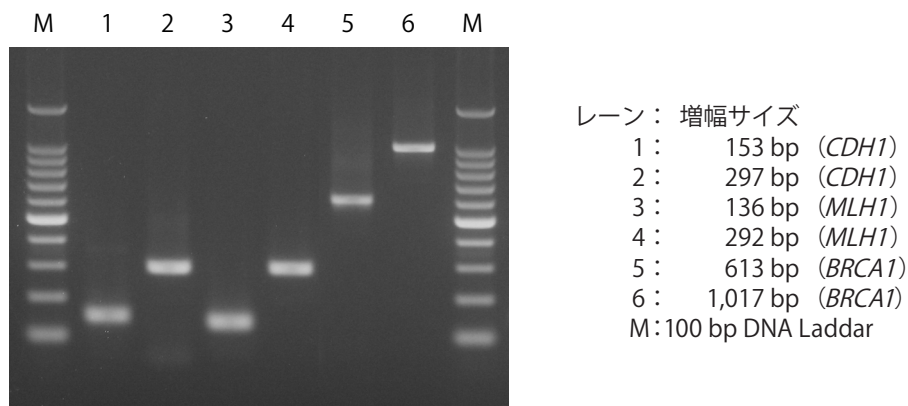
<反応液組成>

試薬	使用量	終濃度
バイサルファイト処理 HeLa ゲノム DNA (50 ng/μl)	2 μl	100 ng/50 μl
10 × EpiTaq PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	5 μl	1 ×
25 mM MgCl ₂	5 μl	2.5 mM
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	6 μl	0.3 mM
Sense Primer (20 μM)	1 μl	0.4 μM
Antisense Primer (20 μM)	1 μl	0.4 μM
TaKaRa EpiTaq HS (5 U/μl)	0.25 μl	1.25 U/50 μl
滅菌精製水	up to 50 μl	

< PCR 条件 >

98°C 10 sec.
55°C 30 sec.
72°C [30 sec./ ~ 500 bp、1 min./500 bp ~] } 40 cycles

【結果】



アガロース：Agarose L03 「TAKARA」 (製品コード 5003/5003B)

ゲル濃度：2%

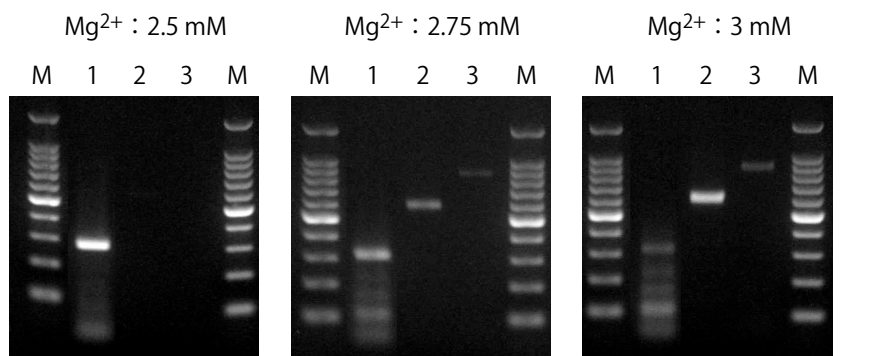
染色法：エチジウムブロマイド染色

図 1. バィサルファイト処理 HeLa ゲノム DNA を鋳型とした PCR

IX. トラブルシューティング

現象	問題点	対策
増幅しない 増幅効率が悪い	Mg ²⁺ 濃度	Mg ²⁺ 濃度を上げる：2.5 mM から 3 mM の間で検討する。(図 2 参照)
	dNTP 濃度	dNTP 濃度を下げる：0.2 mM から 0.3 mM の間で検討する。
	アニーリング温度	55℃より 2℃ずつ下げてみる。
	伸長時間	伸長時間を 30 秒から 1 分、1 分から 2 分に伸ばす。
	プライマー濃度	プライマー濃度を上げる：0.4 μM から 1 μM の間で検討する。
	バイサルファイト処理により 鋳型 DNA が断片化している。	再度バイサルファイト処理した鋳型 DNA を取得する。
エキストラバンドがでる スメアする	Mg ²⁺ 濃度	Mg ²⁺ 濃度を下げる：2 mM から 2.5 mM の間で検討する。
	dNTP 濃度	dNTP 濃度を上げる：0.3 mM から 0.4 mM の間で検討する。
	アニーリング温度	55℃より 2℃ずつ上げてみる。
	プライマー濃度	プライマー濃度を下げる：0.2 μM から 0.4 μM の間で検討する。

※ Mg²⁺ 濃度を低くすると特異性が向上し、Mg²⁺ 濃度を高くすると増幅効率、伸長性が向上します。また、dNTP 濃度を高くすると特異性が向上し、dNTP 濃度を低くすると増幅効率、伸長性が向上します。



レーン：増幅サイズ
 1：316 bp (*CDKN2*)
 2：607 bp (*MLH1*)
 3：877 bp (*MLH1*)
 M：100 bp DNA Ladder

アガロース：Agarose L03「TAKARA」
 ゲル濃度：2%
 染色法：エチジウムブロマイド染色

図 2. Mg²⁺ 濃度の検討による改善例

IX. 関連製品

MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (製品コード ME002)
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (製品コード 5760A/5761A)
T-Vector pMD20 (製品コード 3270)
T-Vector pMD19 (Simple) (製品コード 3271)

X. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- SYBRはLife Technologies Corporationの登録商標です。EpiTaqはタカラバイオ株式会社の、MethylEasyはHuman Genetic Signatures Pty. Ltd.の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社